



TITLE:

# 霊長類脊髄のカルシウムプロテアーゼの性状に関する研究(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

石崎, 泰樹; 黒川, 正則

---

CITATION:

石崎, 泰樹 ...[et al]. 霊長類脊髄のカルシウムプロテアーゼの性状に関する研究(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1985, 15: 55-56

ISSUE DATE:

1985-10-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/163534>

RIGHT:

間後の下垂体を組織学的に検索したところ、中心部の組織は変性しているものの、表面の腺組織の状態は良好で、放出能を保っていたものと考えられる。

その後、個体差を克服するため別の複数の個体より得た下垂体を用い、同様な実験をおこなったが、ラジオリセプター法によってLHの測定結果を出すまでに至っていない。またラジオリセプター法の感度が問題なため、ラット精巣の間細胞を用い、テストステロン生産量をラジオイムノアッセイ法で測定し、LH量を求める方法を試みている。

#### 血中および下垂体中ゴナドトロピンの測定方法の確立

吉田高志(国立予研・霊長類センター)

サル類の黄体形成ホルモン(LH)の測定のためのラジオイムノアッセイ(RIA)には、現状では種々の困難がともなう。そこで、我々は、ラジオリセプターアッセイ(RRA)法の確立を試みた。ラット精巣の間細胞(Leydig cell)分画をリセプターとするこの方法により、カニクイザル(*Macaca fascicularis*)およびニホンザル(*M. f. fuscata*)の血中LHの測定が可能であり、性周期にともなうその濃度の変動について実証することができた。今回は、この両種以外のサル種、特にマカカ属以外のサル種に対する本法の適用の可能性について検討をおこなった。

検討の対象としたのは、オナガザル属のミドリザル(*Cercopithecus aethiops*)、リスザル属のコモンリスザル(*Saimiri sciurea*)、およびマカカ属のアカゲザル(*M. mulatta*)である。動物は、連日採血をおこない、排卵に先きだち血中LH濃度の増加を示すとみられる時期の血清を選んだ。この血清を段階希釈し、RRA系で、カニクイザル下垂体由来LH標準標品と比較した。放射性ヨード標識ホルモンとして、ヒト下垂体標品(LER-960)を用いた。

3種の血清試料と標準標品の間で、反応の平行性その他に有意な差は認められなかった。これにより本方法によってこれら3種の動物の血中LHの測定が可能であると判断された。

カニクイザルの血中LHの測定のために開発さ

れたこのRRA法は、ミドリザルを始めとする狭鼻類下目のサル種のみならず、広鼻類下目のリスザルにも適用でき、ひろく真猿亜目一般の血中LHの測定に適用可能であることが強く示唆された。今後、原猿亜目での適用の可否を検討するとともに、サル類での性周期にともなう血中LH動態の解析が必要である。

#### 課題 13

#### 霊長類脊髄のカルシウムプロテアーゼの性状に関する研究

石崎泰樹・黒川正則(東大・医)

1964年、ラット脳の細胞質分画にカルシウムにより活性化される中性プロテアーゼが見出されて以来、この種の酵素が種々の組織・細胞に存在することが報告されてきた。これまでカルシウムプロテアーゼは細胞質分画から精製されており、その大部分が細胞質分画に存在するとされているが、細胞内局在の詳細はまだ検討されていない。またこの酵素の生理的意義についても確定的な知見は得られていないが、この酵素が筋原線維蛋白、微小管結合蛋白、アクチン結合蛋白、中間径線維蛋白などに作用することから、このプロテアーゼと細胞骨格との関連が注目を集めつつある。

我々はこれまでラットおよびウシの脊髄をトライトンX-100で処理して得られる細胞骨格標品中にカルシウムプロテアーゼが存在することを見出し、この酵素が生理的条件下で細胞骨格に結合して存在することを示唆する知見を得た。本研究ではニホンザル脊髄の細胞骨格標品中にもカルシウムプロテアーゼが存在することを見出し、この酵素の性質をラット酵素、ウシ酵素の性質と比較した。

ニホンザル脊髄の細胞骨格標品は主としてニューロフィラメント・トリプレット蛋白(分子量~200 K, ~160 K, ~68 K)、グリア線維酸性蛋白(分子量~50 K)、アクチン(分子量43 K)から構成されている。この標品にはニューロフィラメントの160 K成分の優先的に分解するカルシウムプロテアーゼが含まれている。この酵素は0.1 mM以上のカルシウムによって活性化され、その

至適 pH は 7~8 に存在し、種々のチオールプロテアーゼ阻害剤により強く阻害される。酵素はイオン強度を非生理的レベルにまで高めないと細胞骨格から遊離しない。また遊離酵素はカルシウムの存在下速やかに失活する。酵素を除去した細胞骨格と遊離酵素を 0.6 MKCl 内で混合した後、透析によって KCl を除くと、プロテアーゼは再び細胞骨格と結合する。

以上より、ニホンザル脊髄細胞骨格にはカルシウムプロテアーゼが結合して存在し、その性質をラット酵素、ウシ酵素と比較した場合、大きな差異は認められないことが明らかになった。

#### 霊長類における血清ペプシノーゲンの定量と臨床応用及び種間変異に関する研究

三木一正(東大・医)・降旗千恵(東大・医科研)

本年度は計画研究の最後の年になるので、従来の成果をまとめるとともに、問題点を絞って遂行した。まず血清ペプシノーゲンの R I A による定量は、特にヒトにおいて多くの臨床データが蓄積した。これらを通じ操作の改良等を行い、また充分な再現性が保証されたので方法的に確立されたと考えている。臨床応用での残る問題点は、微量成分(SMP成分)の R I A が未だ完成しないことにある。種々のクロマト手法を用いてこの成分の精製を行ったが、混在するアルブミンの除去が極めて難しく、純粋標品を得ることができなかった。新たな精製操作を加え、純品を得ることが必要とされる。

種間変異に関しては、ヒト酵素を基準として、R I A 法により各種霊長類の系統関係を求めることにした。ヒトとニホンザル、カニクイザル等のマカクとはよく区別された。この課題での問題は各種霊長類のペプシノーゲン標品を得ることが、比較的困難なことにある。しかしこの点が克服されれば相互の関係は定量的に表わすことができ、系統関係を調べるのに有効な手段と考えている。

#### ペプシノーゲン C 様酵素の組織内分布と季節変動に関する研究

森山昭彦・国枝靖子(名市大・医)

前年度までの研究により、ニホンザルの前立腺および肺組織中に、胃粘膜で合成、分泌されるペプシノーゲン C と、免疫学的、酵素学的に区別できない酸性プロテアーゼ前駆体の存在することが明らかとなった。しかし、これらプロテアーゼ前駆体の生理的役割は全く知られていない。そこで本研究では、この点に関する知見を得るために、その組織内分布と、前立腺のプロテアーゼ前駆体含量の季節変動を調べた。

##### 1. 組織内分布

前立腺の前後葉間、肺の各部位間では、ペプシノーゲン C 様酸性プロテアーゼ前駆体の分布に偏りは見られなかった。しかし、精液および肺洗浄液中にも見出されたこと、又細胞分画による実験では、どちらの組織においても、同プロテアーゼ前駆体は主として、ミトコンドリア〜リソゾーム画分に存在することが示されたことから、この酸性プロテアーゼ前駆体は細胞外へ分泌されていると考えられる。また抗ペプシノーゲン C 抗血清を用いた免疫組織化学の実験では、用いた抗血清の性質のためと思われるが、前立腺および肺組織中に顕著に染色される細胞を特定することはできなかった。今後、より抗体価の高い抗血清を調製することにより、さらにはっきりした結果が得られると思われる。

##### 2. 前立腺および精液中のペプシノーゲン C 様プロテアーゼ前駆体含量の季節変動

前立腺中のプロテアーゼ前駆体含量は、季節差より個体差の方が大きく、季節変動があるとしても、その変化は小さいと思われる。又、精液は、その採取条件により含まれる前立腺液の量が変化するために、やはり季節変動をみることはできなかった。ただ、精液中の含量は微量であり、生殖におけるこの酸性プロテアーゼ前駆体の関与は、あまりないと思われる。